Aus dem Hygienischen Institut der Universität München.
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. K. Kisskalt.

Die Beeinflussung der Sporenresistenz durch die Porosität des Materials.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Berthold
aus Bayreuth.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1940.

1940
Buchdruckerei Karl Döres, Erlangen, Jägerstraße 3

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Referent:

Geheimrat Prof. Dr. Karl Kisskalt.

Meinen lieben Eltern!

Seit den Arbeiten R. Kochs liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die das zunehmende Interesse für die hohe Widerstandsfähigkeit der in der Erde enthaltenen „nativen" Sporen der Erdbakterien erkennen lassen. All diese Vielzahl von Forschungen konnte jedoch die Resistenz der Erdsporen gegenüber der Wärme noch nicht einwandfrei klären. Wenn man das Schrifttum überblickt, so findet man in den verschiedenen Auffassungen einen chronologischen Entwicklungsgang, der damit anfängt, daß man die Ursache der Thermostabilität der Sporen in der nativen Spore selbst begründet suchte. Es sind Auffassungen vertreten worden, welche die Beschaffenheit des Sporeneiweißes und den Wassergehalt der Spore dafür verantwortlich machen. Ferner führte man die Sporenresistenz auf eine derbe Sporenmembran zurück. Als alle Forschungen zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, vermutete man die Ursache in der umgebenden Erde. Die Untersucher deuteten ihre Beobachtungen dahin, daß die Erde als ein Nährboden günstige Nährstoffe für die Entstehung sehr widerstandsfähiger Bakterienformen liefere. Demgegenüber vertritt man jetzt die Auffassung, daß die Erde durch mechanisch-chemisch-physikalische Faktoren die Einwirkung der Hitze auf die Sporen hemmt und abschwächt, ohne dadurch nennenswerte biologische Veränderungen an den Sporen hervorzurufen.

Die Ursache für die Resistenz suchte Cramer (1) in der Spore selbst; sie schien ihm in der Ausbildung von schwer durch hohe Temperatur zu schädigender Eiweißkörper zu beruhen. Seine Auffassung stützte sich auf die Beobachtungen von Globig (2), Miquel (3), van Tieghen (4) und Garrigon (5), die feststellten, daß sich verschiedene Bakterien nur bei hohen Temperaturen entwickeln und fortpflanzen, während sie bei niedriger absterben. Cramer (1) legte ferner seinen Versuchen die Auffassung zu Grunde, „daß in einem verschiedenen Wassergehalt des Sporeneiweißes und des Eiweißes der vegetativen Formen der Grund der verschiedenen Resistenz gefunden werden könnte". Nach seinen Ergebnissen beruht die Widerstandsfähigkeit der Sporen

gegen trockene Hitze auf dem hohen Trockengehalt des Eiweißes. Hailer (6) führt die Sporenresistenz auf die Wasser- und Salzarmut des Sporeninhaltes zurück. Durch konzentrierte Lösungen konnten v. Angerer und Küster (7) eine Verzögerung des Hitzetodes von Sporen und Bakterien erreichen. Sie schlossen daraus, daß diese Substanzen in den Zelleib eindringen und eine relative Trocknung bewirken, welche die Resistenz steigert. In neuerer Zeit haben Henry und Friedmann (8) nochmals nachgeprüft, ob die starke Wärmeresistenz der Sporen gegenüber den vegetativen Formen an dem geringeren Wassergehalt der Sporen liegt. Es zeigte sich jedoch, daß der Unterschied so gering war, daß sich darüber keine bindenden Schlüsse auf die Resistenz der Sporen ziehen lassen können.

Eine Reihe von Versuchen widmete Lewith (9) der Erforschung der resistenzsteigernden Wirkung der Sporenhaut. Nach seiner Ansicht erfolgt bei der Bildung der Sporen eine Anhäufung von Protoplasma unter Wasserabgabe. Seine Ergebnisse faßt er dahingehend zusammen: „je geringer der Wassergehalt der Sporen und je undurchdringlicher die Sporenmembran ist, desto größer ist die Resistenz der Sporen". Auch Eckelmann (10) sieht die Ursache in einer größeren Widerstandsfähigkeit der derben Sporenhaut. Diese Auffassung wird von Arthur Meyer (11) und Cramer (1) nicht geteilt. Diese Anschauung von der großen Isolierungsfähigkeit der Sporen, wodurch die Temperatur im Innern nur sehr langsam ansteigen soll, halten auch Virtanen, Artturi und Pulkki (12) nicht für richtig. Aus ihren Untersuchungsergebnissen schließen sie, daß das Nichtvorkommen der meisten lebenswichtigen Enzyme in aktiver Form in den Sporen die Ursache für die große Wärmeresistenz bildet. Daß die Sporenmembran für Hitze undurchlässiger wäre, will auch Heim (13) nicht annehmen; er sucht den Grund in einer eigenartigen Modifikation des Eiweißes.

1895 veröffentlicht Christen (14) eine Arbeit, in der er die Resistenzzunahme von Keimen, die er aus der Erde in Reinkultur gewonnen hatte, darauf zurückführt, daß die Sporen in der Erde geeigneteres Material zur Bildung einer resistenteren Sporenschale finden. Den Einfluß der Bodenart auf das Vorkommen widerstandsfähiger Sporen prüft Stührk (15). Er nahm Proben aus den verschiedensten Böden und Kontinenten und beobachtete, daß neben dem Nährmedium auch das Alter der Sporen, der Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung, pH. und schließlich die Zahl der der Hitze ausgesetzten Sporen von Einfluß auf die Resistenz sind. Jettmar (16) fand bei der Untersuchung von Bodenarten — wie vorher Konrich (17) — die höchstresistenten Sporen haupt-

sächlich an Fundstellen, in welchen starke Kompostierung und Verrottung von organischem Material vor sich ging. Den Einfluß von verschiedenen Zusätzen zum Nährboden stellte auch Williams O. B. (18) fest und konnte zeigen, welche Verringerung oder Erhöhung die Resistenz dadurch erfährt. Denselben Nachweis erbrachten ferner v. Wahl (19), Heiduschka (20), Reiter (21), Apfelbeck (22) und Seßler (23). Auf diese Arbeiten stützt Oesterle (24) hauptsächlich seine Auffassung, wonach die Bakterien in den Fäulnisprodukten der gedüngten Erde die für ihre Entstehung günstigen Nährstoffe vorfinden; als weitere Punkte sind nach seiner Ansicht Klima, Temperatur, Feuchtigkeit und noch zu analysierende Faktoren von Bedeutung. Demgegenüber konnte v. Angerer (25) durch Züchtung auf Nährböden, denen irgendeine Substanz zugesetzt war, keine Resistenzsteigerung mit einwandfreiem positiven Ergebnis erzielen. Die Veröffentlichungen von Wahl (19), Eckelmann (10) und Stührk (15) veranlaßten Sobernheim und Mündel (26) zum Einfluß des Nährsubstrates Stellung zu nehmen. Sie stellen den resistenzsteigernden Einfluß für bestimmte Sporenarten nicht in Abrede. Doch halten sie manche Beobachtung nicht mehr ganz für beweiskräftig, weil die Sporenmenge und noch andere wichtige Faktoren bei den vergleichenden Versuchen nicht gebührend berücksichtigt wurden. Sie stellten verschiedene Versuche an, durch die sie nachweisen konnten, daß die Erde keinen resistenzsteigernden Einfluß auf die Sporen ausübt, der darin besteht, daß durch Nährstoffe biologisch hochwertige und widerstandsfähigere Sporenrassen entstehen.

Oesterle (24) untersuchte den Einfluß der Luftentfernung auf die Widerstandsfähigkeit der Sporenerde. Nach seiner Ansicht wird die Verzögerung des Absterbens dadurch bedingt, daß zwischen den einzelnen Erdteilchen Luftbläschen vorhanden sind, die ein mechanisches Hindernis für den Dampfzutritt darstellen. Schon Bushnell (27) und Konrich (17) machten Versuche bei verschiedenem Vakuum; sie stellten übereinstimmend fest, daß das Vakuum keinen Einfluß auf den Hitzeabtötungspunkt der Sporen besitzt. Die Ergebnisse von Oesterle (24) zeigten eine geringe Resistenzerhöhung für gesättigten Wasserdampf, die aber bei weitem der Widerstangsfähigkeit der nativen Sporen nicht gleichkommt.

Verschiedene Forscher suchten durch selektive Züchtung eine Steigerung der Hitzeresistenz zu erreichen. Magoon (28) setzte Sporen hoher Temperatur aus; die überlebenden Kulturen besaßen eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen Wärme als die Originalsporen. Durch fortgesetzte Selektion dieser Art kann man nach seinen Beobachtungen einen Stamm gewinnen,

dessen Sporen gegen Erhitzung mindestens 25 mal widerstandsfähiger sind als die Sporen der Ausgangskultur. In keinem Falle konnte Williams F. (29) jedoch eine Steigerung der Sporenresistenz feststellen, der bei der Weiterzüchtung unter normalen Bedingungen nicht durchwegs wieder eine verminderte Widerstandsfähigkeit gefolgt wäre. Auf Grund dieser Feststellungen kommt er zu dem Ergebnis, daß die Hitzeresistenz keine charakteristische und konstante Eigenschaft für einen Bakterienstamm ist. Die Untersuchungen von Mündel und Schmid (30), bei denen Sporen, die die höchste Einwirkungszeit von Kochhitze überstanden hatten, weitergezüchtet wurden, erbrachten bei den weiteren Passagen im Vergleich zur Ausgangskultur ebenfalls keine Steigerung der Resistenz. Die Hitzeresistenz lag jedoch bei einer Brut-temperatur von 46 Grad Celsius höher als bei 37 Grad. Ebenso war es Jettmar (16) gelungen, durch Züchtung von Erdbazillen bei 45 Grad Kulturen erhöhter Wärmeresistenz zu gewinnen.

Nach diesen Ergebnissen schien nur die biologische Verschiedenheit der Sporen den Ausschlag für die Resistenzunterschiede zu geben. Erst durch die systematischen Untersuchungen von Sobernheim und Mündel (26), die Klarheit schafften über die Widerstandsfähigkeit von „nativen" Sporen und „Kultur"-Sporen gegenüber siedendem Wasser und strömenden Dampf und durch die weiteren Versuche mit aus der Erde ausgewaschenen Sporen und künstlich infizierter Erde, zeigte sich, welchen Schutz die Erde den Sporen gewährt.

Die Verfasser ermittelten die Kochresistenz der genuinen Erde, der entsprechenden Kultursporen als Emulsion und schließlich die Resistenz der mit Kultursporen imprägnierten Erde. Sie konnten zeigen, daß die Erdproben nach Sterilisierung und Imprägnierung mit den entsprechenden Kulturen fast genau so resistent waren, wie die gleichen Erdproben in natürlichem Zustand. Da die Widerstandsfähigkeit der Kultursporen in einer wässerigen Emulsion gegen Siedehitze ganz bedeutend verringert war, zeigte sich deutlich der resistenzerhöhende Einfluß der Erde.

Beide konnten durch einen Versuch weiterhin nachweisen, daß die Widerstandsfähigkeit der Sporen um so größer ist, je fester sie mit den Erdpartikelchen verbunden sind. Sie untersuchten ferner die Abhängigkeit der resistenzsteigernden Wirkung der Erde von dem Zusatz ihrer Menge zu gleichen Kultursporenmengen. Sie fanden dabei, die Hitzebeständigkeit wird um so größer, je mehr Erde man den Sporen beimengt.

Zur weiteren Verankerung ihrer Auffassung gingen die Verfasser dazu über, Sporen aus ihrer Erde zu isolieren und sie möglichst frei von jedem Erdpartikelchen zu kochen. Dadurch war die Resistenz gegen siedendes Wasser beträchtlich herabgesetzt. Freilich lag sie fast 3- bis 4 mal so hoch als bei Kultursporen. Diese Erscheinung erklärten die Verfasser damit, daß dem Auszug doch noch einzelne schützende Bodenpartikelchen anhaften, die eine Resistenzverlängerung bewirken. Um dafür den Beweis anzutreten, wählten sie eine in der Weise abgeänderte Versuchsanordnung, daß statt der genuinen Erde eine künstlich mit Kultersporen imprägnierte Erdprobe Verwendung fand. Aus dieser wurden durch Schütteln die Sporen wieder isoliert und dem Einfluß des siedenden Wassers ausgesetzt. Diese ausgeschüttelten Kultursporen zeigten eine geringere Resistenz als die in der Erde verbliebenen, übertrafen jedoch die Widerstandsfähigkeit der gewöhnlichen Sporenemulsionen. Damit stand fest: „Der Schutz, den die Erde gewährt, erklärt die höhere Widerstandsfähigkeit der ‚nativen' Erdsporen."

In einem weiteren Versuch lassen Sobernheim und Mündel (26) Kultursporen in sterilisierter Erde wachsen, um eine innige Verbindung zwischen Erde und Sporen zu erreichen. Damit konnten sie eine Widerstandsfähigkeit erzielen, die der von nativen Erdsporen mindestens gleichkam.

Diese Ergebnisse vertieften die Verfasser noch durch ihre Beobachtungen und Feststellungen über das Verhalten der Erdsporen bei der Dampfsterilisation. Sie fanden übereinstimmend mit den Ergebnissen beim Kochversuch eine wesentlich niedrigere Resistenz der Kultursporen im strömenden Dampf als die gleichen Sporen in der genuinen Erde. Bei der Durchtränkung der sterilisierten Erde mit Kultursporen war jedoch im Vergleich zur Kochresistenz ein anderes Verhalten zu beobachten. Während die Resistenz von genuiner und imprägnierter Erde im siedenden Wasser fast keinen Unterschied erkennen ließ, war die Dampfresistenz der imprägnierten Erde weit vermindert. Dieses veränderte Verhalten glaubten die Verfasser darin begründet, daß einmal durch die Sterilisierung die Erde in ihrer ganzen Struktur verändert würde; außerdem wäre die verschiedenartige Wärmeeinwirkung bei der Dampfsterilisation und dem Kochversuch die Ursache. In einem weiteren Versuch stellten Sobernheim und Mündel (26) Sporenauszüge aus genuiner Erde und künstlich imprägnierter Erde her. Es ergab sich zwischen Koch- und Dampfresistenz kein Unterschied. Damit bestätigte sich erneut,

daß die große Widerstandsfähigkeit der Erdsporen gegen Wärme nicht an biologische Eigenschaften der Sporen gebunden ist, sondern auf dem Vorhandensein von Erdpartikelchen beruht.

Nach diesen vergleichenden Versuchen kommen die Verfasser zu der Ueberzeugung: „Die nativen Erdsporen haben in dem Augenblick der Loslösung von den Erdteilchen ihre weit überlegene Dampfresistenz verloren und widerstehen dem Dampf keineswegs länger als die aus der Erde wieder ausgewaschenen Kultursporen. — ... Damit ist der Beweis geliefert, daß die hohe Dampfresistenz der Gartenerde nicht auf einem Gehalt an Erdsporen von besonders widerstandsfähiger Eigenart beruht, sondern im wesentlichen durch mechanische Momente bedingt sein muß."

Diese Feststellungen gaben v. Angerer (25) Veranlassung, die Veränderungen der Resistenz zu untersuchen, die durch die Adsorption der Sporen an Erde entstehen sollten. Nach ihrer Meinung sollte damit eine Steigerung der Sporenresistenz verbunden sein. Ihre zahlreichen Versuche ergaben dafür keinen Anhaltspunkt; ebensowenig bestätigte sich ihre Auffassung, daß der Fettgehalt der Sporen für die Widerstandsfähigkeit maßgebend wäre.

Da nach den Angaben von Sobernheim und Mündel (26) die Sporen mit der Loslösung von den Erdteilchen ihre überlegene Dampfresistenz verlieren, wäre der Gedanke erlaubt, anzunehmen, daß der Dampf an der Erde Widerstände findet, die ihn verhindern, die Sporen abzutöten. Im Erdboden sind zahlreiche feine Hohlräume, in die auch Sporen gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die Hohlräume für die resistenzsteigernde Wirkung der Erde von Bedeutung sind. Der sich in den Bläschen abspielende Vorgang beim Einwirken strömenden Dampfes wurde sich so vorgestellt, daß der Dampf beim Eindringen in die Hohlräume behindert wird; infolgedessen kann die darin befindliche Luft nicht verdrängt werden und entweicht nur soweit, wie es ihre Ausdehnung durch die Erwärmung im Dampftopf verlangt. Sonach sind die Sporen in einem solchen Hohlraum nur trockener, erhitzter Luft ausgesetzt, was genau denselben Verhältnissen wie bei der Sterilisation in Heißluft entspricht.

Zunächst ist es notwendig, auf die Struktur des Bodens einzugehen und dabei die Hohlraumverhältnisse zu beleuchten, wie sie prozentual festgestellt wurden. In dem Handbuch der Bodenlehre erfahren wir von Blank (31) darüber Einzelheiten. Danach

wird durch die Art der Lagerung der Bodenteilchen das Hohlraumvolumen, das zur Aufnahme von Wasser und Luft zur Verfügung steht, bestimmt. Das Porenvolumen beträgt bei Gartenerde in 1,5 m Tiefe 46,1% des Bodenvolumens. Das Hohlraumvolumen bei lockerster Lagerung und dichtester Lagerung schwankt zwischen 47,64% und 25,95% des Gesamtvolumens. Daraus geht hervor, wie stark porös der Boden ist und wie viele luftgefüllte Hohlräume sich in ihm befinden.

Zu den beabsichtigten Versuchen waren sehr widerstandsfähige Kulturensporen notwendig. Da die hiesige Sporenerde nur Sporen geringerer Resistenz enthielt, wurden hochresistente Kultursporen verwendet, die in freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. Sobernheim zur Verfügung gestellt wurden.

Der erste Versuch sollte die Verhältnisse beim Eintritt des Dampfes in Hohlräume zeigen. Um diese Vorgänge etwas deutlicher zu gestalten, wurden sterile Reagensgläser im unteren Drittel der Innenfläche mit feuchter Sporenerde, die aus dem Hyg. Institut Würzburg stammte, bestrichen und verschieden verschlossen. Der Verschluß bestand aus Watte, Zellstoff und Kork. Ein Röhrchen blieb ohne Verschluß, ein zweites wurde offen in ein größeres Reagensglas gestellt, ein weiteres wurde auf der Außenseite bestrichen. Außerdem wurden zwei Petrischalen innen ausgestrichen und eine davon in eine Drigalskischale gebracht. Nach Antrocknung der Erde wurden die Röhrchen und Platten einer bestimmten Temperatur im Autoklaven ausgesetzt und nach der Entnahme mit Leberbouillon übergossen und bebrütet. Begonnen wurde mit einer Temperatur, bei der das Manometer 113 Grad anzeigte. Mit Erreichen der gewünschten Temperaturhöhe wurde der Autoklav abgestellt.

Bei den öfters wiederholten Versuchen zeigten alle Röhrchen und Platten nach der Einwirkung dieser Anfangstemperatur Wachstum. Bei 114 Grad traten beim außen bestrichenen Röhrchen einige Versager auf. Diese Ausfälle stellten sich mit 115 Grad auch bei den Röhrchen ein, die mit Watte und Zellstoff verschlossen waren, bzw. ohne Verschluß waren. Bei 116 Grad zeigte die innen bestrichene Petrischale einige Male Sterilität, während das Reagensgläschen ohne Verschluß vollkommen ohne Wachstum blieb. Steril blieben ab 117 Grad das mit Watte und Zellstoff verschlossene Röhrchen, ferner die innen bestrichene Platte. Ab 118 Grad war endlich das außen bestrichene Röhrchen steril. Mit 119 Grad zeigte die in der Drigalskischale stehende Platte kein Wachstum und ab 120 Grad auch das in einem größeren Reagensglas untergebrachte Röhrchen. Von jetzt ab wurde die Temperatur von 120 Grad immer eine weitere Minute einwirken lassen mit dem

Erfolg, daß bei dem gut mit Kork verschlossenen Röhrchen selbst nach 25 Minuten Hitzeeinwirkung Wachstum bestand. Dieses Ergebnis läßt nur geringfügige Unterschiede zwischen dem offenen und den mit Watte und Zellstoff verschlossenen Röhrchen sowie der geschlossenen Petrischale erkennen. Die Erwartung, wonach das außen bestrichene Röhrchen am frühesten steril sein müßte, hat sich nicht bestätigt. Dagegen entsprach das Ergebnis der fester verschlossenen Gefäße (Röhrchen mit Korkverschluß, im größeren Reagensglas untergebrachte Röhrchen, Platte in Drigalskischale) einigermaßen der Erwartung. Abschließend muß festgestellt werden, daß das Eindringen des Dampfes in Hohlräume nur wenig behindert wurde. Ferner zeigte der Versuch gleichzeitig, wie notwendig der Zutritt der feuchten Hitze zum Abtöten der Erdsporen ist.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurde fein zerkleinerter Koks als Keimträger verwendet. Dieses Material sollte noch hinreichend genug Hohlräume enthalten, das den Sporen Unterschlupf bietet und infolge der größeren Bläschen weit günstigere Verhältnisse für die Sporen schafft als der Erdboden. Dieser Keimträger wurde mit Sporen infiziert, auf Leinenläppchen gebracht und in trockenem und feuchtem Zustand dem strömenden Dampf ausgesetzt. Bei dem feuchten Koks war es dem Dampf unmöglich gemacht worden, in die Bläschen einzudringen, weil sich bereits Flüssigkeit darin befand. Somit müßte das Ergebnis im Vergleich zum trockenen Koks gleich ausfallen, wenn die Auffassung richtig wäre, daß der strömende Dampf in die Hohlräume nicht einzudringen vermag. Vergleichsweise wurden bei dem Versuch Proben verwendet, bei denen durch Evakuieren Sporen in die innersten Bläschen gebracht worden waren.

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: Gewöhnlicher Gaskoks wurde im Mörser zerschlagen und durchgesiebt. Die Entnahme aus der Einsatzgröße I 5 des Knoopschen Siebsatzes ergab das verwendete Material. Nach der Sterilisierung im Autoklaven wurde es im Brutschrank mehrere Tage lang getrocknet. Einige Gramm wurden entnommen, in einen 50 ccm Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 10 ccm einer G-Kultursporenaufschwemmung übergossen. Dieser Kolben blieb mindestens 7 Stunden im Kühlschrank stehen. Sterile Leinenläppchen wurden zu zweimal 10 Stück im Erlenmeyerkolben infiziert und die Hälfte unter Zellophan im Brutschrank getrocknet. In einem zweiten Kolben wurden ebenfalls einige Gramm Koks mit 10 ccm derselben Aufschwemmung übergossen und evakuiert. 20 Läppchen wurden damit infiziert und wieder die Hälfte getrocknet. So standen für jeden Versuch 40 Läppchen zur Verfügung, von denen jedesmal die Hälfte naß und trocken bzw.

evakuiert und nicht evakuiert war. Auf einem Gazegestell wurden sie dem strömenden Dampf bei 100 Grad ausgesetzt und bis zu einer Stunde 10 minütlich und von da ab stündlich entnommen. Anschließend erfolgte Bebrütung in Leberbouillonröhrchen bei 37 Grad.

Im Ergebnis blieben die nassen Läppchen etwas widerstandsfähiger; doch betrug der Unterschied gegenüber den trockenen nur 1 bis 2 Stunden, wobei die getrockneten Läppchen bis 3 und 4 Stunden Wachstum zeigten. Die evakuierten Läppchen waren nicht resistenter. Diese Versuchsanordnung weist in der Beziehung Mängel auf, daß die Koksmenge und die Konzentration der Sporenaufschwemmung nicht festgelegt war.

Sobernheim und Mündel (26) fanden, daß sich mit der Vermehrung des Erdquantums die Kochresitenz der Kultursporen steigern läßt. Infolgedessen wurde die Versuchsanordnung dahin abgeändert, daß eine bestimmte Materialmenge verwendet wurde. Ferner wurde die Keimdichte der Aufschwemmung bestimmt. Durch den Versuch sollte festgestellt werden, ob sich Resistenzunterschiede bei Kultursporen finden, die grobem und pulverisiertem Koks angetrocknet waren und in Flüssigkeit (Leberbouillon) dem strömenden Dampf ausgesetzt wurden. Damit waren dieselben Verhältnisse gegeben wie bei der Einwirkung siedenden Wassers. Zugleich wurde Quarzsand, der statt Höhlen durchgehende Porosität zeigt, derselben Hitze ausgesetzt. Alle drei Serien wurden nach dem Infizieren mit Kultursporen evakuiert.

Nach der Sterilisierung des in 50 ccm Erlenmeyerkolben abgefüllten Kokses und Quarzsandes in Mengen von 0,2 g wurde je 1 ccm einer H-Kultursporenaufschwemmung von der Keimdichte 10—20 Mill. im ccm zugegeben und 15 Minuten evakuiert. Nach dem Uebergießen von 10 ccm Leberbouillon wurden die Kolben dem Dampftopf übergeben und wieder zu denselben Zeiten wie beim vorausgehenden Versuch entnommen.

Nach der Bebrütung zeigte sich bei dem mit Quarzsand beschickten Kolben eine Verlängerung des Wachstums um eine Stunde gegenüber den beiden anderen Versuchsreihen, die mit 3—4 Std. Sterilität bewahrten.

Aus den Erfahrungen und Ergebnissen der Vorversuche wurde der Hauptversuch aufgebaut. Der Gaskoks als Keimträger wurde beibehalten. Selbst wenn er infolge chemischer Eigenschaften eine schädigende Einwirkung auf die Sporen ausübt und eine Resistenzminderung verursacht, so spielt das für den vorliegenden Versuch keine Rolle, weil nur Koks von genau derselben chemischen Beschaffenheit miteinander verglichen wird. Der grobe Koks

war wieder von bestimmter Größe und dem Siebsatz I 3 des Knoopschen Siebsatzes entnommen worden. Als Vergleichsmaterial wurde feinst pulverisierter Koks verwendet. Durch die mechanische Zertrümmerung sollten die vorhandenen Bläschen soweit wie möglich vernichtet werden, damit ein Material ohne Hohlräume entsteht. Daß dadurch neue Faktoren auftreten, die nicht unberücksichtigt bleiben dürfen, ist verständlich. Bei den Angaben über die Bodenstruktur wurde mitgeteilt, daß die Hohlräume zur Aufnahme von Wasser und Luft zur Verfügung stehen. Folglich muß man auch umgekehrt aus dem Luft- bzw. Wassergehalt Rückschlüsse auf die Hohlräume ziehen können. Wollny (32) fand, daß der Boden in pulverförmigem Zustand weniger Luft enthält als in krümeligem. Auf diese Feststellung stützte sich die Auffassung, daß sich durch Pulverisierung eine Verringerung der Hohlräume erzielen läßt, die sich allerdings nur auf die Höhlen insgesamt erstreckt. Eine Verringerung der kleinsten Hohlräume dürfte nicht eintreten. Ferner war zu bedenken, ob nicht durch die Schichthöhe dieses Pulvers neue Unterschlupfmöglichkeiten für die Sporen entstehen, die gerade die gewünschte Absicht verhindern. Oesterle (24) konnte zeigen, daß die Schichthöhe bei der Sporenerde nur von sehr geringem Einfluß auf die Abtötungszeit der nativen Erdsporen ist. Damit verlor auch dieser Faktor an Bedeutung. Des weiteren mußte berücksichtigt werden, ob durch die Pulverisierung die Adsorptionswirkung gesteigert wird. Darüber teilt v. Angerer (25) Beobachtungen mit, die sie bei Kohle gemacht hat. Danach zieht die Kohle aktiv einen Teil der freien Sporen aus der Flüssigkeit. „Die Adsorption ist allerdings geringer, als sie unter Verwendung feinst verteilter Adsorbentien, zum Beispiel pulverisierter Kohle . . . erzielt werden kann." Daraus geht hervor, daß mit einer erhöhten Adsorptionswirkung gegenüber dem groben Material gerechnet werden muß. Ein Vergleichsversuch mit feinem Material erübrigte sich, nachdem v. Angerer (25) feststellen konnte, daß bei ihren Versuchen die Abtötungszeit für grobe und feine Kohle fast gleich war.

Dieses grobe und pulverisierte Material wurde wie bei den von Sobernheim und Mündel (26) ausgeführten Versuchen in Mengen von 0,2 g den Petrischalen eingefüllt. Mit Erlenmeyerkolben konnte nicht weitergearbeitet werden, weil sie durch ihre enge Oeffnung selbst einen Hohlraum bilden, wodurch unsere Untersuchungen über den Einfluß der Höhlenbildung des Materials auf die Sporenresistenz ungenau werden. Die beiden Plattenserien wurden mit dem Material im Heißluftschrank bei 160 Grad 4 Stunden sterilisiert und 2—4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis das Material wieder einen gewissen Feuchtigkeitsgrad erreicht hatte.

Zur Herstellung der Sporenaufschwemmung wurden durchwegs Sporen vom Stamme H verwendet, die nach 4—5 Tagen gut versport waren. Sobernheim und Mündel (26) verwendeten in der Regel 4—5 tägige Schrägagarkulturen. Statt dessen wurden in diesem Falle die Kulturen auf Weizengriesagarplatten hergestellt, die bei 37 Grad im Brutschrank vollständige Versporung zeigten. Der Weizengriesagar war nach der Vorschrift von Heider (33) hergestellt. Für die H-Kultursporen gibt Sobernheim eine Dampfresistenz von 14—24 Stunden in genuiner Erde an. Für die Versuche wurden Aufschwemmungen mit einer Keimdichte von 20 bis 300 Mill. benützt. Die Aufschwemmung wurde mehrmals filtriert, um eine gleichmäßige Verteilung des Sporenmaterials in der Flüssigkeit zu erreichen. Vorausgegangene Versuche zeigten, wie schnell Sporenaufschwemmungen im Wasser trotz kühler Aufbewahrung an Resistenz verlieren; es wurde deshalb für jeden Versuch eine frische Aufschwemmung hergestellt. Aus diesem Grunde schwanken die Angaben der Keimdichte in einem größeren Spielraum. Coulthard (34) machte ebenfalls die Beobachtung, daß die Sporenaufschwemmung in Wasser nicht die gleiche Resistenz für Vergleichsuntersuchungen für längere Zeit halten. Es wird bei den einzelnen Versuchen die Keimdichte der Aufschwemmung angegeben, weil sich nach den Feststellungen von Ficker (35), Reichenbach (36), Patzschke (37), Lange (38), Göbel (39), Behrens (40), Hückel (41), Sobernheim und Mündel (26) und Eijkmann (42) dichtere Keimaufschwemmungen widerstandsfähiger gegen Wärme verhalten als weniger dichte. Stutz (43) kommt zwar zu dem gegenteiligen Ergebnis, doch stellten Sobernheim und Mündel (26) erneut unter Beweis, daß die Abtötungszeit der Sporen bei 100 Grad von der Sporenzahl abhängig ist.

Nach der Ueberimpfung von 1,0 ccm der Aufschwemmung wurde durch Schütteln für innige Mischung mit dem Material gesorgt. Dann wurde die Hälfte der Schalen, die grobes und pulverisiertes Material enthielten, bei einer Temperatur von 10—17 Grad Celsius $1\,^1/_2$ Stunden mit der Oelpumpe evakuiert. Das angewandte Vakuum betrug 700 mm Hg. Anschließend standen die Schalen ca. 12 bis 20 Stunden im Kühlschrank. Die Tränkungszeit, die nach den Untersuchungen von v. Angerer (25) 7 Stunden beträgt, wurde nicht unterschritten. Vor dem Einsetzen des so vorbereiteten Versuches wurden die Platten zur Vermeidung von Kondenswasserbildung in einem Heißluftschrank auf 90 Grad vorgewärmt und dann dem Kochschen Dampftopf übergeben, der eine durchschnittliche Temperatur von 97,5 Grad erreichte.

Nach der 10 minütlichen bzw. stündlichen Entnahme aus dem Dampftopf wurde das grobe Material steril pulverisiert, damit auch die innersten Hohlräume dem später darübergegossenen Traubenzuckeragar zugänglich wurden. Die Bebrütung dieser Platten erfolgte im Brutschrank bei 37 Grad. Da die Proben 14—20 Stunden dem strömenden Dampf ausgesetzt wurden, mußten sie nach Art der Verhältnisse nachtsüber im Kühlschrank abgestellt werden. Diese Unterbrechung konnte das Versuchsergebnis nicht beeinflussen, da Sobernheim und Mündel(26) nachweisen konnten, daß weder das Alter des Stammes noch das der Kultur selbst über Jahre eine Rolle spielt.

Bei dem so ausgeführten ersten Versuch mit Koks und einer Keimdichte der Aufschwemmung von 30 bis 50 Mill. war beim groben Material nach 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 Stunden Wärmeeinwirkung Wachstum nachweisbar, bei pulverisiert war 1, 2, 3, 4, 9 positiv. Das grob evakuierte Material zeigte Wachstum bei 1, 2, 3, 7 und 12 Stunden, positiv war bei pulverisiert evakuiert 1, 2, 3, 6 und 11 Stunden. Der Versuch war bis zu 12 Stunden ausgedehnt worden; alle übrigen Platten zeigten kein Wachstum.

Der Ausgang dieses Versuches ließ über den wahren Sachverhalt noch nichts erkennen, da infolge der Springer die Zwischenglieder fehlten.

Der zweite Versuch mit Koks wurde mit einer Aufschwemmung von 75—100 Mill. im ccm durchgeführt.

Nach der Bebrütung waren beim groben Material bei 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14 Stunden Sporen gewachsen, während das pulverisierte Material Wachstum nur bis zur 7. Stunde zeigte. Das evakuierte Material verhielt sich dagegen folgendermaßen: Grob wuchs bis zur 8. Stunde und pulverisiert bis zur 6. Stunde, jedoch zeigte die Platte nach 12 Stunden Hitzeeinwirkung ebenfalls Wachstum.

Nach dem Ausgang dieses Versuches, der bis zur 16. Stunde ausgeführt wurde, bestehen Unterschiede zwischen grobem und pulverisiertem Material in der Weise, daß die an grobem Koks angetrockneten Sporen resistenter sind. Vergleicht man grob mit derselben aber evakuierten Probe, dann ergibt sich eine Resistenzminderung. Da aber durch die Evakuierung allein keine Verringerung der Resistenz entstehen kann, müssen diese Unterschiede, selbst wenn sie mehrere Stunden betragen, noch in den Grenzen des Normalen liegen.

Es wurden deshalb noch weitere Versuche angeschlossen, um zu vermeiden, daß auf Grund dieses einen vielleicht zufälligen Ergebnisses das abschließende Urteil gefällt wird.

Ein dritter Versuch unter Verwendung einer Konzentration von 50—100 Mill. im ccm der Aufschwemmung lieferte folgendes Ergebnis. Grob war positiv nach 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16 Stunden, pulverisiert nach 4. 5, 6, 8, 13, 14 Stunden. Das grobe evakuierte Material wuchs zusammenhängend bis zur 18. Stunde, die pulverisierte Probe dagegen nur bis zur 9. Stunde und eine Platte außerdem bei der 12. Stunde. Die letzten Proben wurden nach 19 Stunden Dampfeinwirkung entnommen.

Im vierten Versuch wurde statt Koks aktive Kohle verwendet. Aktive Kohle hat ebenfalls eine sehr poröse Struktur und schien sich für unsere Versuche zu eignen. v. Angerer (25) fand bei grob granulierter Kohle die Abtötung der Sporen verzögert. Die überimpfte Keimdichte betrug 50—100 Mill. Die übrige Versuchsanordnung blieb dieselbe. Das Ergebnis gestaltete sich so, daß grob bei 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 Stunden positiv war, bei pulverisiert waren Sporen nachweisbar bei 5, 6, 9, 12 Stunden. Bei den evakuierten Proben war grob nach 1, 2, 5, 6, 7, 9, 13 Stunden, pulverisiert nach 1, 3, 5, 7, 9, 10 Stunden positiv. Der Versuch erstreckte sich über 14 Stunden. Auffällig waren bei diesem Ergebnis die zahlreichen Lücken. Die Versuche mit aktiver Kohle wurden mehrfach wiederholt, jedoch traten jedesmal wieder zahlreiche Lücken zwischen den positiven Ergebnissen auf.

Dieses merkwürdige Verhalten der aktiven Kohle gab Veranlassung zu einer anderen Versuchsanordnung. Es wurden unter genau denselben Bedingungen zwei Versuche nebeneinander durchgeführt, von denen der eine Koks, der andere aktive Kohle enthielt. Nach dem Bebrüten waren von den Platten, die bis zu 20 Stunden im Dampftopf waren, positiv: grob bei 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 17 Stunden, pulverisiert bei 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 Stunden; evakuiert grob bei 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 17 Stunden und evakuiert pulverisiert bei 4, 5, 7, 10, 11, 15, 17 Stunden. Im Vergleichsversuch mit aktiver Kohle waren Sporen gewachsen bei der 5., 8. und 13. Stunde bei grob, bei pulverisiert in der 6. und 14. Stunde, bei evakuiert grob in der 12. und 13. Stunde und bei evakuiert pulverisiert nur in der 6. Stunde. Bei beiden Versuchen wurde erst ab 4. Stunde mit der Probeentnahme aus dem Dampftopf begonnen.

Damit war erwiesen, daß die lückenhaften Ergebnisse bei den Proben von aktiver Kohle kein Zufallsergebnis waren, sondern in der Beschaffenheit der Kohle beruhten. Bei einem erneuten Versuch mit aktiver Kohle ließ sich allerdings ein etwas lückenloseres Ergebnis erzielen. Die Probeentnahme erstreckte sich auf die Zeit von 10 Minuten bis 14 Stunden. Die Keimdichte der Aufschwemmung lag höher und betrug 90—150 Mill. Dieser Versuch

ergab folgende positiven Platten: grob bei 10 Min. bis 5 Stunden, 7., 8., 10., 11. Stunde; pulverisiert 10 Minuten bis 5 Stunden, ferner 7., 12., 13, Stunde; evakuiert grob 10 Minuten bis 1 Stunde, 3., 4., 7., 9. und 13. Stunde; evakuiert pulverisiert 10 Minuten bis 1 Stunde, ferner 3., 4., 5. und 8. Stunde.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden auch verschiedene Filtermaterialien, die eine bestimmte Porengröße hatten, als Keimträger verwendet. Zuerst wurde Bisquitporzellan in die grobe und pulverisierte Form übergeführt und wie bei den vorausgehenden Versuchen beimpft. Die Keimdichte betrug 90—150 Mill. im ccm. Die Entnahme der Proben begann mit 10 Minuten und wurde bis zur 12. Stunde fortgesetzt. Beim groben Material zeigte sich Wachstum von 10 Minuten bis 9 Stunden, ferner nach 11 Stunden, bei pulverisiert waren die Ergebnisse positiv von 10—50 Minuten, 3, 4, 5, 12 Stunden, bei evakuiert grob von 10 Minuten bis 5 Stunden, ferner 7, 8, 9, 12 Stunden und bei evakuiert pulverisiert von 10, 20, 40, 50 Minuten, 3, 4, 7, 8, 9, 12 Stunden.

Ferner wurde zu einem Versuch Berkefeldfilter als Material verwendet. Das damit erzielte Ergebnis lautet folgendermaßen: Positiv war bei grob: 10 Min. bis 3 Stunden, 7, 9, 11, 13 Stunden; bei pulverisiert: 10—50 Minuten, 3, 11 Stunden; bei evakuiert grob: 10, 20, 30, 60 Minuten, 2, 3 Stunden; bei evakuiert pulverisiert: 10—50 Minuten, 3 Stunden.

Sobernheim und Mündel (26) erwähnen einmal bei der Kritik eines Versuchsergebnisses: „Selbst Gegensätze von 5 und 7 Stunden oder 8 und 10 Stunden bedeuten noch so dicht beieinander liegende Sterilisationszeiten, daß Unterschiede nicht als wesentlich betrachtet werden können." Dieser Satz gilt auch für die vorausgegangenen Versuche. Es zeigt sich bei keiner Probe eine Resistenzveränderung, die bei allen Versuchen gleichmäßig deutlich hervortreten würde. Daraus läßt sich schließen, daß die Resistenz der Kultursporen in den vorliegenden Untersuchungen nicht auf dem Vorhandensein von Hohlräumen im Material beruht. Auch der Einfluß von verschieden großen Poren, wie sie sich im Filtermaterial befanden, konnte nicht festgestellt werden. Durch die gleichzeitig ausgeführten Versuche mit evakuiertem Material ließ sich keine Resistenzerhöhung der Sporen erzielen. Dadurch bestätigte sich die Annahme nicht, daß durch Evakuieren die Sporen zahlreicher in die innersten Materialhöhlen gelangen und dadurch der Hitzeeinwirkung besser widerstehen können.

Zusammenfassung.

1. Zu Beginn der Arbeit werden die verschiedenen Auffassungen über die Ursache der Wärmeresistenz der Erdsporen wiedergegeben, wobei auf die Theorie von Sobernheim und Mündel an Hand ihrer Versuchsergebnisse besonders eingegangen wird.

2. Die eigene Auffassung wird dargestellt. Danach soll der Dampfzutritt zu den Hohlräumen der Erde behindert sein und die dort befindlichen Sporen nicht abtöten können, weil sie dadurch nur der Einwirkung von Heißluft ausgesetzt sind.

3. Die Verhältnisse beim Dampfeintritt in Hohlräume werden an einem Versuch geprüft. Eine erhebliche Behinderung tritt nicht ein.

4. Zwei Vorversuche werden beschrieben.

5. Aufbau und Grundlagen des Hauptversuches werden dargelegt und die Ergebnisse mehrerer Versuche wiedergegeben. Es werden Proben, die zahlreiche Hohlräume enthalten, mit solchen verglichen, deren Hohlräume mechanisch zertrümmert wurden. Die Resistenz der Sporen gegen Hitze läßt sich dadurch nicht beeinflussen. Ebensowenig spielt die Hohlraumgröße dabei eine Rolle. In Aufschwemmung evakuiertes Material erweist sich nicht widerstandsfähiger als nicht evakuiertes.

An dieser Stelle gestatte ich mir, Herrn Geheimrat Professor Dr. K. Kisskalt für die freundliche Ueberlassung des Themas, für die liebenswürdige Uebernahme der Durchsicht der Arbeit und des Referates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literatur:

1. Cramer: Arch. Hyg. 13, 71 (1891).
2. Globig: Zitiert Cramer nach Z. Hyg. 3, 294 u. 322 (1888).
3. Miquel: Zitiert Cramer nach Annuaire de l'observatoire de Montsouris 1881, p. 464.
4. van Tieghen: Zitiert Cramer nach Societe botanique de France. Bulletins. T. 28, p. 35.
5. Garrigon: Zitiert Cramer nach Compt. rend, T. 103, p. 703.
6. Hailer: Weyls Handbuch d. Hyg. 2. Aufl. 8, 1213 (1918).
7. v. Angerer u. Küster: Arch. Hyg. 122, 57 (1939).
8. Henry u. Friedmann: Z. Hyg. Ref. 39, 385 (1937).
9. Lewith: Zbl. Bakter. Ref. 7, 477 (1890).
10. Eckelmann: Zitiert Oesterle nach Zbl. Bakter. 48, 140 (1918).
11. Meyer A.: Zit. Oesterle nach Ber. dtsch. bot. Ges. 24, 340 (1906).
12. Virtanen, Artturi u. Pulkki: Zbl. Hyg. 29, 326 (1933).
13. Heim L.: Lehrbuch d. Bakter. 204 (1922).
14. Christen: Zitiert Oesterle nach Mitt. Klin. u. med. Inst. Schweiz (1895).
15. Stührk: Zbl. Bakter. II, 93, 161 (1935).
16. Jettmar: Zit. Oesterle nach Abh. Ges. geb. d. Hyg. 22 (1936).
17. Konrich: Z. Hyg. 112, 62 (1931) u. zitiert Oesterle nach Dtsch. Z. Chir. 245, 141.
18. Williams O. B.: Z. Hyg. 21, 712 (1930).
19. v. Wahl: Zit. Oesterle nach Zbl. Bakt. II, Ref. 16, 489 (1906).
20. Heiduschka: Arch. Hyg. 115, 54 (1934).
21. Reiter: Arch. Hyg. 89, 191 (1920).
22. Apfelbeck: Arch. Hyg. 91, 245 (1922).
23. Seßler: Arch. Hyg. 94, 88 (1924).
24. Oesterle: Zbl. Bakter. Orig. 141, 187 (1938).
    Arch. Hyg. 117, 16 (1936).
    Zbl. Bakter. I, 141, 187 (1938).
25. v. Angerer: Arch. Hyg. 121, 12 (1938).
26. Sobernheim u. Mündel: Z. Hyg. 118, 328 (1936) und Z. Hyg. 121, 90 (1938).
27. Bushnell: Zit. Oesterle nach Journ. of bact. Vol. 7, 283 (1922).
28. Magoon C. A.: Z. Hyg. 13, 369 (1927).
29. Williams F.: Z. Hyg. 39, 82 (1937).
30. Mündel u. Schmid: Arch. Hyg. 119, 20 (1937).
31. Blank: Handbuch der Bodenlehre VI, 28 (1930).
32. Wollny: Zit. Blank nach Forschgn. Geb. Agrikult.-Phys. 8. 369.
33. Heider: Arch. Hyg. 15, 341 (1892).
34. Coulthard: Z. Hyg. 38, 66 (1937).
35. Ficker: Z. Hyg. 29, 1 (1898).

36. Reichenbach: Z. Hyg. 69, 171 (1911).
37. Patzschke: Z. Hyg. 81 (1916).
38. Lange: Z. Hyg. 96, 92 (1922).
39. Göbel: Z. Hyg. 100, 380 (1923).
40. Behrens: Z. Hyg. 100, 388 (1923).
41. Hückel: Z. Hyg. 106, 730 (1926).
42. Eijkmann: Zit. Lange nach Biochem. Ztschr. 11, 12 (1908).
43. Stutz: Z. Hyg. 120, 243 (1938).